

Title	基質特異的阻害剤をツールとするグリコシダーゼの生物有機化学的研究：遷移状態 基質アナログ複合体グリコシダーゼ阻害剤の合成と応用
Author(s)	平竹, 潤
Citation	(2006)
Issue Date	2006-06
URL	http://hdl.handle.net/2433/84767
Right	学術雑誌掲載論文の抜き刷り、出版社に著作権許諾が得られていないため未掲載。
Type	Research Paper
Textversion	publisher

**基質特異的阻害剤をツールとするグリコシダーゼの生物有機化学的研究
—遷移状態：基質アナログ複合体グリコシダーゼ阻害剤の合成と応用—**

(課題番号 13480187)

**平成13年度～平成15年度科学研究費補助金（基盤研究（B）(2)）
研究成果報告書**

平成16年6月

京都大学図書



1040941296

附属図書館

研究代表者

平竹 潤

(京都大学化学研究所)

はしがき

本報告書は、平成13年より平成15年までの3年間にわたり、科学研究費補助金（基盤研究（B）（2））を受けて行った、グリコシダーゼの生物有機化学的研究についての成果報告である。

一般にグリコシダーゼと総称されるグリコシド加水分解酵素は、基質特異性、アミノ酸配列、反応機構および立体構造、そのいずれをとっても、きわめて多様性に富む巨大な酵素群を形成している。現在、酵素のアミノ酸配列にもとづく Henrissat らの分類法が一般化され、グリコシド加水分解酵素は 96 種類にもよるファミリーに分類されている (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/GH.html>)。この分類は、酵素の立体構造や反応機構（立体化学）ともよく対応し、多様なグリコシダーゼを構造にもとづいて分類し研究するための非常に有効な手段となっているが、構造的には同じファミリーに属する酵素でも、グリコン部の基質特異性が全く異なる酵素が多数あること、また逆に、同じグリコン基質特異性をもつ酵素でも、構造的には全く別のファミリーに分類されることがあるなど、酵素の「構造」と「見た目の酵素学的性質」との間にねじれが生じる場合が少なくない。これは、ひとえに、グリコシダーゼの多様性に由来する本質的な問題である。一方、the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) の定める、従来の Enzyme Nomenclature では、加水分解酵素であるグリコシダーゼは、切断する結合および基質の種類にもとづいて分類され、すべて EC. 3.2.1 (enzymes hydrolysing O- and S-glycosyl compounds) というコード番号の下に、151 グループにわたって分類されている (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/>)。しかし、この分類法は、酵素の基質特異性や基質の構造をもとにした分類であるため、酵素の構造や反応機構を必ずしも反映しない。このように、グリコシダーゼのもつきわめて大きな多様性は、グリコシダーゼを研究対象とする場合につきまとう本質的な問題であり、これをいかにうまく扱うかが、グリコシダーゼ研究のポイントの一つである。

そこで、本研究代表者らは、グリコシダーゼ研究、特に、構造未知の酵素を相手にする場合、「見た目の基質特異性」を指標にすることが多いことに着目した。すなわち、グリコシダーゼの発見から単離精製、その酵素学的性質の解明に至るあらゆる研究段階で、グリコン部、アグリコン部および、アノマー位の立体化学という3つのパラメーターによって記述される「基質特異性」にもとづいて、グリコシダーゼの諸性質や構造を予測し、研究が進められる点である。なかでも、グリコン部の基質特異性は、構造未知のグリコシダーゼを研究するにあたって、まずはじめに着目する、重要な、そして多くの場合、ほぼ唯一の手がかりであり、これを指標に酵素を単離精製し、構造を決定していく場合が多い。すなわち、まず酵素のグリコン基質特異性は何かを調べるところから研究がスタートし、基質を選択し、それを指標として酵素の単離・精製を進め、得られたグリコシダーゼの酵素学的諸性質を基質特異性の観点から明らかにし、また、部分アミノ酸配列の決定から、酵素をコードする遺伝子のクローニングと全一次配列の決定を経て、Henrissat の分類による構造予測へと至るのが通例である。したがって、酵素の（グリコン）基質特異性は、これら一連のグリコシダーゼ研究のほぼ全領域にわたって利用される最も基本的な性質であるばかりでなく、精製された酵素の性質を記述する場合にも、必ず用いられる基本的なパラメーターとなっている。また、グリコシダーゼが生体内でどのような生理学的意義をもっているかを解明する、より生物学的な研究においても、まず、それがどの「糖」に作用する酵素なのかが問われる場合が多い。以上のことを考慮すると、グリコシダーゼ研究の「ツール」として有用な化合物は、こうした酵素の（グリコン）基質特異性を色濃く反

映した選択性の高い阻害剤であろう。

本研究は、以上のような観点に立ち、有用な研究ツールとなる新規なグリコシダーゼ阻害剤を、酵素の反応機構と基質認識にもとづいて合理的に設計し、それをよりどころとして、グリコシダーゼの生物有機化学的研究を展開したものである。すなわち、(1) 合成が簡便で、さまざまな糖から容易に大量に調製でき、しかも、酵素の基質特異性に応じた高い選択性を示す β -グリコシルアミジン誘導体と呼ぶ新規な阻害剤を開発し、(2) それを応用したアフィニティークロマトグラフィーにより、グリコン特異性を唯一の指標としてグリコシダーゼを単離精製する手法を確立、さらに、(3) グリコシダーゼ阻害剤を生物体(植物)に直接作用させることにより、グリコシダーゼのもつ生理学的意義をさぐる手がかりを得た。本研究の成果は、グリコシダーゼを研究するにあたり、酵素の単離・精製から遺伝子のクローニングに至る一連の研究のあらゆる段階において有用な研究ツールを開発し、実際にそれが役に立つことを実証した点にあり、この研究手法や阻害剤が、これからのグリコシダーゼ研究の現場の多くで広く使われていくことを願ってやまない。

研究組織

研究代表者： 平 竹 潤 (京都大学化学研究所)
研究分担者： 水 谷 正 治 (京都大学化学研究所)
研究分担者： 高 田 正 保 (株式会社 日本食品化工 研究所)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 13 年度	4,700	0	4,700
平成 14 年度	1,800	0	1,800
平成 15 年度	1,500	0	1,500
総計	8,000	0	8,000

研究発表

(1) 学会誌等

- Guo, W.; Hiratake, J.; Ogawa, K.; Yamamoto, M.; Ma, S.-J.; Sakata, K. β -Glycosylamidines: Potent, Selective, and Easily Accessible β -Glycosidase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 467-470 (2001).
- Ma, S.-J.; Mizutani, M.; Hiratake, J.; Hayashi, K.; Yagi, K.; Watanabe, N.; Sakata, K. Substrate Specificity of β -Primeverosidase, a Key Enzyme in Aroma Formation during Oolong Tea and Black Tea Manufacturing. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 2719-2729 (2001).

- Ma, S.-J.; Hiratake, J.; Nakai, Y.; Izumi, M.; Fukase, K.; Kusumoto, S.; Sakata, K. A Direct Continuous Spectrophotometric Assay for Glycosidases with 3-Nitro-2-pyridyl Glycosides by Tautomerization of 2-Hydroxy-3-nitropyridine. *Anal. Biochem.* **302**, 291-297 (2002).
- Hiratake, J.; Sakata, K. Glycosylamidines as Potent Selective and Easily Accessible Glycosidase Inhibitors and Their Application to Affinity Chromatography. *Methods in Enzymology* **363**, 421-444 (2003).
- Sakata, K.; Mizutani, M.; Ma, S.-J.; Hiratake, J. Diglycoside-Specific Glycosidases. *Methods in Enzymology* **363**, 444-459 (2003).
- Inoue, K.; Hiratake, J.; Mizutani, M.; Takada, M.; Yamamoto, M.; Sakata, K. β -Glycosylamidine as Ligand for Affinity Chromatography Tailored to Glycon Substrate Specificity of β -Glycosidases. *Carbohydr. Res.* **338**, 1477-1491 (2003).

(2) 口頭発表

- 平竹 潤、加藤正宏、小川浩一、高田正保、高選択的グリコシダーゼ阻害剤：グルコシルアミジン誘導体の合成と阻害活性。第4回生体触媒シンポジウム(仙台)、2001年1月19日。
- 大西利幸、清水文一、Seung-Jin Ma、平竹 潤、坂田完三、チャ葉に含まれる二糖配糖体 β -primeverosides の大量合成法の検討。日本農芸化学会関西支部第418回講演会(京都)、2001年2月3日。
- 井上和子、平竹 潤、水谷正治、坂田完三、 β -Glucosylamidine をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィー：チャ葉 β -グルコシダーゼのワンステップ精製。日本農芸化学会 2001 年度大会(京都)、2001年3月25日。
- Seung-Jin Ma、平竹 潤、中井康司、深瀬浩一、楠本正一、坂田完三、3-ニトロ-2-ピリジルグリコシドを用いた糖加水分解酵素活性の連続測定法。日本農芸化学会 2001 年度大会(京都)、2001年3月26日。
- 加藤正宏、平竹 潤、高田正保、山本幹男、坂田完三、グリコシダーゼ阻害剤： β -Glucosylamidine 誘導体のアグリコン部が阻害活性に与える影響。日本農芸化学会 2001 年度大会(京都)、2001年3月25日。
- 馬 勝、平竹 潤、水谷正治、清水文一、渡辺修治、坂田完三、茶の香気生成酵素 β -プリメベロシダーゼの基質の合成および酵素学的特性の解明。第43回天然有機化合物討論会(大阪)、2001年10月3日。
- 平竹 潤、加藤正宏、井上和子、高田正保、山本幹男、坂田完三、選択的 β -グリコシダーゼ阻害剤 β -glycosylamidine 誘導体の合成と応用。第43回天然有機化合物討論会(大阪)、2001年10月3日。
- J. Hiratake, M. Kato, M. Takada, K. Inoue, M. Yamamoto, K. Sakata, β -Glycosylamidines as "Tailor-made" β -Glycosidase Inhibitors with High Potency

and Selectivity. 5th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations (BioTrans 2001, Darmstadt, Germany), 2001年9月4日

- ・ 平竹 潤、 β -Glycosylamidine as Tailor-made Inhibitors of β -Glycosidases: Synthesis and Applications. SPing8 セミナー (理研播磨研究所)、2001年10月24日
- ・ J. Hiratake, Glycosylamidines as potent and selective glycosidase inhibitors: synthesis and applications. 5th Hirschegg Winter School on Chemical Biology (Hirschegg, Austria), 2002年2月16-23日
- ・ 八木健介、渡辺修造、浅井辰夫、坂田完三、平竹 潤、山本幹男、高田正保、Turnbul Colin、バラ主要香気成分 2-phenylethanol 精製・発散における β -glucosidase の役割に関する研究. 日本農芸化学会 2002 年度大会 (仙台)、2002年3月24日
- ・ 奥津令子、Ma Seung-Jin、平竹 潤、清水文一、坂田完三、コンビナトリアル的手法によるグリコシダーゼの基質特異性の迅速決定法 第1報. 日本農芸化学会 2002 年度大会 (仙台)、2002年3月25日
- ・ 井上和子、平竹 潤、水谷正治、坂田完三、 β -Glycosylamidine をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィー (第2報) グリコン特異性に基づく β -グリコシダーゼの効率的な精製. 日本農芸化学会 2002 年度大会 (仙台)、2002年3月25日
- ・ 加藤正宏、平竹 潤、高田正保、山本幹男、坂田完三、グリコシダーゼ阻害剤: β -Glucosylamidines のアグリコン部分による選択的阻害. 日本農芸化学会 2002 年度大会 (仙台)、2002年3月25日
- ・ 平竹 潤、研究ツールとしての酵素阻害剤: グリコシダーゼを中心として. 日本農芸化学会 2002 年度大会シンポジウム (仙台)、2002年3月25日
- ・ 張 正竹、水谷正治、平竹 潤、井上和子、宛 暁春、坂田完三、チャ葉由来2種類の β -グルコシダーゼのアフィニティー精製と性質. 日本農芸化学会関西支部第425回例会・ミニシンポジウム (大阪)、2002年7月6日
- ・ 平竹 潤、張 正竹、水谷正治、井上和子、宛 暁春、坂田完三、 β -Glucosylamidine をリガンドとする β -グルコシダーゼのアフィニティー精製 チャ葉由来2種の β -グルコシダーゼの精製と性質. 日本応用糖質科学会創立 50 周年記念大会 (東京)、2002年9月18日
- ・ 平竹 潤、研究ツールとしてのグリコシダーゼ阻害剤—グリコシルアミジン誘導体の合成と応用—. 科学研究費補助金特定領域研究「コンポジット生体触媒の分子設計と進化工学」第1回公開シンポジウム (京都)、2002年10月18日
- ・ 平竹 潤、選択的 β -グリコシダーゼ阻害剤のデザイン β -Glycosylamidine 誘導体の設計と合成、その応用. 京都大学化学研究所第102回研究発表会 (宇治)、2002年12月6日

- ・ 平竹 潤、新規グリコシダーゼ阻害剤の開発と応用. 近畿バイオ関連産業プロジェクト連携促進事業 技術シーズ公開会 (大阪)、2003 年 2 月 17 日
- ・ 平竹 潤、選択的 β -グリコシダーゼ阻害剤 β -glycosylamidine 誘導体の設計と合成、その応用. 日本農芸化学会関西支部第 430 回例会およびミニシンポジウム (大阪)、2003 年 7 月 12 日
- ・ 宇野哲也、加藤正宏、平竹 潤、坂田完三、環状グルコシルアミジンの合成と β -N-アセチルグルコサミニダーゼに対する阻害活性. 日本農芸化学会関西支部・中部支部合同大会 (京都)、2003 年 10 月 5 日
- ・ Masahiro, K.; Hiratake, J.; Takada, M.; Ogawa, K.; Sakata, K., Inhibition of β -Glucosidases by β -Glucosylamidine Derivatives, The 9th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-9、京都)、2003 年 11 月 11 日
- ・ Kato, M.; Hiratake, J.; Takada, M.; Ogawa, K.; Sakata, K., Glycosylamidines as Potent and Selective Glycosidase Inhibitors, First International Symposium on Biomolecular Chemistry (ISBC2003, 淡路)、2003 年 12 月 4 日
- ・ 齋野広道、水谷正治、平竹 潤、坂田完三、二糖配糖体特異的グリコシダーゼ β -プリメベロシダーゼの昆虫細胞による大量発現. 日本農芸化学会 2004 年度大会 (広島)、2004 年 3 月 30 日

(3) 出版物

- ・ 平竹 潤、坂田完三 選択的 β -グリコシダーゼ阻害剤の分子設計と応用. 化学と生物 **40**, 352-354 (2002).
- ・ 平竹 潤 研究ツールとしてのグリコシダーゼ阻害剤—その設計と応用—. 日本農芸化学会誌 **77**, 409-412 (2003).
- ・ 平竹 潤、坂田完三 新規グリコシダーゼ阻害剤 β -グリコシルアミジン誘導体の開発と応用. *BIOINDUSTRY* **8**, 44-51 (2003).

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

- ・ 糖質アミジン誘導体、坂田完三、平竹 潤、碓氷泰市、日本食品化工株式会社、特願平 2000-62197、特開 2001-247589 (2001/9/11)、P2001-247589A
- ・ グリコシダーゼの精製に利用される吸着体およびその調製方法、並びに、グリコシダーゼ精製方法、坂田完三、平竹 潤、山善株式会社、坂田完三、平竹 潤、特願 2001-44121 (2001/2/20)、特開 2002-243714 (2002/8/28)、P2002-243714A

研究成果

本研究の成果は、大きく分けて以下の4つのカテゴリーに分類される。

- (1) β -グリコシルアミジン誘導体の設計と合成
- (2) β -グリコシルアミジン誘導体をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィー
- (3) β -グリコシルアミジン誘導体を用いた植物 β -グリコシダーゼの生理機能の探索
- (4) その他の成果

すなわち、「はしがき」にも記したとおり、酵素のグリコン特異性に対応して、酵素を高い選択性で阻害する有用な化合物として、 β -グリコシルアミジン誘導体を合理的に設計、合成し、さまざまな酵素に対する阻害活性を測定することにより、その阻害の特徴と選択性を明らかにした合成的研究、 β -グリコシルアミジン誘導体をリガンドとするアフィニティー吸着体により、基質特異性を指標として、グリコシダーゼをアフィニティー精製する手法を確立した研究、そして、植物体に対して、 β -グリコシルアミジン誘導体を直接与えることにより生じる形態学的な変化を指標に、植物の生体内で重要な働きをするグリコシダーゼを予測した *in vivo* の研究である。

以下、順を追って研究成果をまとめる。

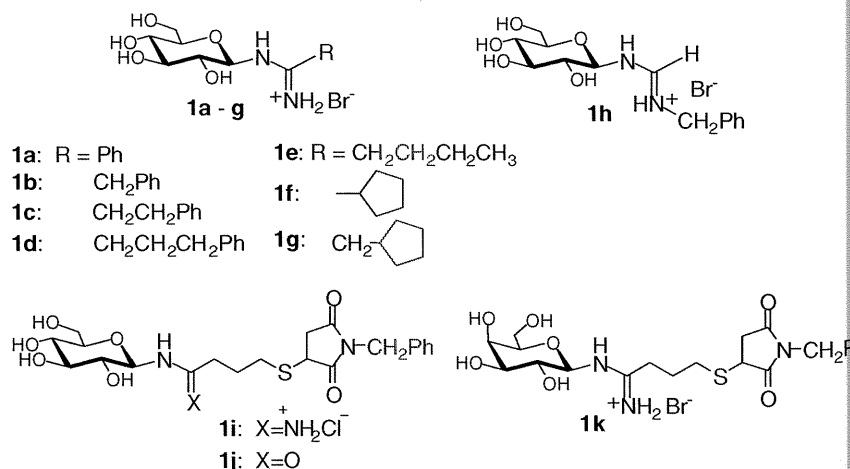
(1) β -グリコシルアミジン誘導体の設計と合成

1-1. β -グリコシルアミジン誘導体の基本設計と阻害活性

β -グリコシルアミジン誘導体の基本的設計と、その阻害活性については、文献1 (Guo, W; Hiratake, J.; Ogawa, K.; Yamamoto, M.; Ma, S.-J.; Sakata, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 467-470 (2001)) および、文献2 (Hiratake, J.; Sakata, K. *Methods in Enzymology* **363**, 421-444 (2003)) を参照。

1-2. アグリコン部の構造展開と阻害活性

文献1および2で述べたとおり、 β -グリコシルアミジン誘導体は、さまざまな糖から保護基を使わず、わずか2ステップで高収率で合成でき、 K_i 値にして $0.1 \mu\text{M}$ レベルの強い阻害活性を示すばかりでなく、酵素のグリコン基質特異性およびアノマー位の立体化学特異性に応じた高い選択的阻害活性を示すことが判明した。一方、多くのグリコシダーゼでは、基質のグリコン部分のみならず、アグリコン部分(糖の還元末端に位置する非糖アルコール部分)に対する基質認識も重要であり、この部分が酵素の基質特異性を決める上で重要な働きを担っている場合が多い。そこで、基質ア



ナログである β -グリコシルアミジン誘導体のアグリコン部分に、さまざまなアルキルおよびアリール置換基を導入し、その阻害活性を調べた。すなわち、 β -glucosylamidine 誘導体 **1a-i**、対応する β -glucosylamide **1j**、および β -galactosylamidine **1k** を合成し、各種グリコシダーゼに対する阻害活性を測定することにより、アグリコン部分の構造が阻害活性に及ぼす影響を調べ、糖部分のみならずアグリコン部に対する酵素の基質特異性を利用して、より選択性の高いグリコシダーゼ阻害剤を開発するための基礎データを得た。

(方法)

典型的な合成法は以下のとおりである。

β -Glucosylamidine 誘導体 **1c**

β -Glucosylamine (350 mg 1.95 mmol) を dry pyridine に懸濁し、氷冷下、チオイミデート **4c** (505 mg 1.94 mmol) を加え、0 °C で 7 hr 攪拌し、反応終了後、減圧濃縮した。濃縮液を水に溶かしミリポアフィルターにより濾過した。これを中圧逆相カラムクロマトグラフィー (ODS-S-50D、山善株式会社) に供し、水で溶出した (2-10 mL/min)。溶出液は 254 nm の吸収を指標にモニターし、化合物を含むフラクションを濃縮、凍結乾燥したところ、白色の粉末が得られた (624 mg, 82 %)。 $[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ -38.2° ($c = 1.03$, H₂O); IR (KBr) λ_{max} 3200 (br), 1670, 1610, 1040 cm⁻¹; ¹H-NMR (400MHz, D₂O) δ 7.41-7.30 (m, 5H, phenyl), 4.74 (d, $J = 8.0$, 1H, H-1), 3.89 (dd, $J = 12.0$ and 2.0 , 1H, H-6b), 3.75 (dd, $J = 12.4$ and 5.4 , 1H, H-6a), 3.43-3.58 (m, 4H, H-2, H-3, H-4, H-5), 3.06 (t, $J = 7.4$, 2H, CH₂), 2.85 (t, $J = 7.4$, 2H, CH₂); ¹³C-NMR (100MHz, D₂O) δ 172.0 (C=N), 140.8, 131.3, 131.1, 129.5 (phenyl), 83.7 (C-1), 80.1 (C-5), 78.7 (C-3), 74.1 (C-2), 71.4 (C-4), 63.0 (C-6), 37.4, 35.2 (CH₂CH₂Ph); Anal. Calcd. for C₁₅H₂₃BrN₂O₅ · 0.5H₂O: C, 45.01; H, 6.04; N, 7.00. Found: C, 44.92; H, 6.12; N, 7.00. HRMS (FAB) Calcd. for C₁₅H₂₃BrN₂O₅ (M⁺) 311.1607, found 311.1597.

β -Glucosylamidine 誘導体 **1i**

β -Glucosylamine (179 mg 1.0 mmol) と 2-iminothiolane HCl (138 mg 1.0 mmol)、*N*-benzylmaleimide (187 mg 1.0 mmol) を 5 mL の dry pyridine 中に同時に加え、0 °C で 4.5 hr 攪拌し、反応終了後、減圧濃縮した。濃縮液を水に懸濁し酢酸エチルで洗浄し、水層を取り減圧濃縮後、ミリポアフィルターにより濾過した。これを中圧逆相カラムクロマトグラフィー (ODS-S-50B、山善株式会社) に供し、5% の MeOH で溶出した (6 mL/min)。溶出液は 254 nm の吸収を指標にモニターし、化合物を含むフラクションを濃縮、凍結乾燥したところ、白色の粉末が得られた (348 mg, 69 %)。Anal. Calcd. for C₂₁H₃₀ClN₃O₇S · 1.05H₂O: C, 48.24; H, 6.19; N, 8.04. Found: C, 48.24; H, 6.00; N, 8.34%. HRMS (FAB) Calcd. for C₂₁H₃₀N₃O₇S (M-Cl) 468.1839, Found 468.1811.

各種グリコシダーゼのアッセイと阻害活性は、基質特異性、立体特異性およびオリジンの異なる 9 種類の酵素を用いて測定した。各種グリコシダーゼおよび測定の方法は以下にあげる通りである。

- ① β -D-glucosidase from *Aspergillus niger*, chromatography purified, 日本食品化工(株)海野博士より供与, 42.9 U/mg prot. (pNP- β -Glc, pH5.0, 30°C)
- ② β -D-glucosidase from *Trichoderma viride*, chromatography purified, 静岡大学岡田先生より供与, 1.15 mg prot./ml, 26.4 U/mg prot., 30.5 U/ml (pNP- β -Glc, pH5.0, 30°C)

- ③ α -D-glucosidase from *Aspergillus niger*, chromatography purified, 日本食品化工(株)海野博士より供与, 5.2 mg prot./ml, 278.4 U/ml (maltose, pH 4.2, 37°C)
- ④ α -D-glucosidase from *Bacillus* sp. 東洋紡(株)製, 製品名 AGH-211, Lot. 35521, 62.6 U/mg (pNP- α -Glc, pH 7.0, 37°C)
- ⑤ α -D-glucosidase from Yeast, オリエンタル酵母(株), Lot. 21933501, 14.0 U/mg (maltose, pH 6.0, 25°C)
- ⑥ β -D-galactosidase from *Aspergillus oryzae*, SIGMA 社製, カタログ No. G-7138, Lot. 121H0055, 5.1 U/mg solid (oNP- β -Gal, pH 4.5, 30°C)
- ⑦ β -D-galactosidase from *Escherichia coli*, SIGMA 社製, カタログ No. G-5635, GRADE VIII, Lot. 55H6851, 520 U/mg solid, 650 U/mg prot., (oNP- β -Gal, pH 7.3, NaPi buf., 37°C)
- ⑧ α -D-galactosidase from *Aspergillus niger*, SIGMA 社製, カタログ No. G4408, Lot. 98H7820, 0.17 mg prot./ml, 60 U/mg prot. (pNP- α -Gal, pH 4.0, 25°C)
- ⑨ β -D-xylosidase from *Aspergillus pulverulentus*, 天野製薬(株)製⁶ クチナーゼ G の部分精製品, Lot. 971023, 3.5 U/ml (pNP- β -Xyl, pH 4.0, 40°C)

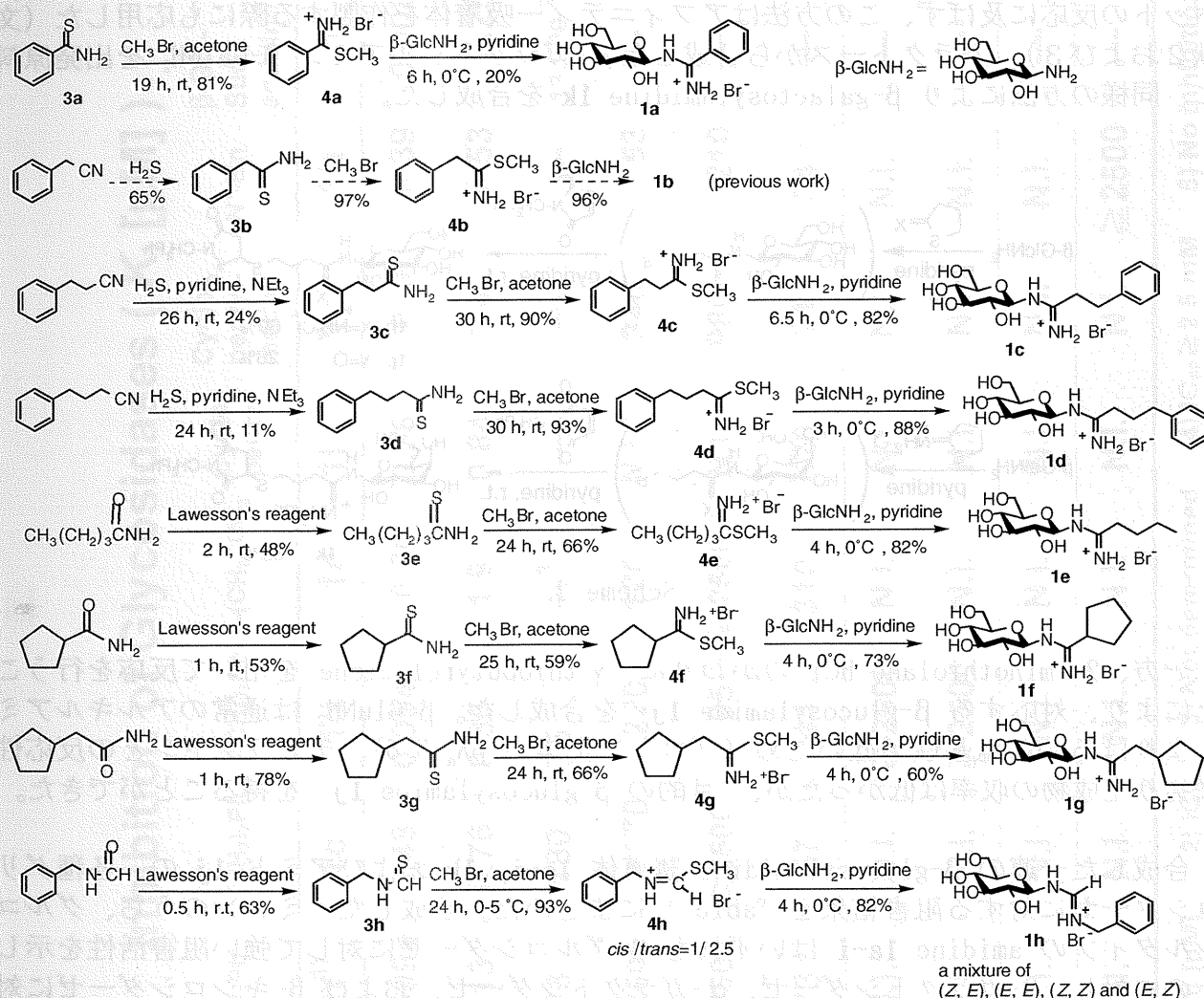
酵素アッセイおよび阻害活性の測定方法を、*A. niger* 由来 β -glucosidase を例として記す。

pNP- β -Glucoside を最終 0.75 および 1.5 mM 含む 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) に、 β -glycosylamide 誘導体を阻害剤として 0 - 0.005 mM になるように溶解し、適当濃度に希釈した酵素液 (200 μ g/mL の BSA で希釈) を 50 μ L 添加し、総液量を 1000 μ L とした。30°C で 10 分間反応させたのち、1 M Na₂CO₃ 溶液 500 μ L を添加し、405 nm の吸光度を測定し (pNP, $\epsilon = 17.8125 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$)、反応速度を求めた。阻害定数 K_i 値の評価は、Dixon plot ($1/v - [I]$) を用いて行い、2 種の基質濃度においてそれぞれ $1/v_0$ と阻害剤濃度をプロットし、その交点から K_i と阻害形式を求めた。各プロットの直線は最小二乗法により求め、相関係数 0.990 未満になる直線は削除し、再度測定を行った。

(結果および考察)

β -Glucosylamide 1a-h の合成スキームおよび収率を Scheme 1 に示す。
 β -Glucosylamide 1a-h は、 β -グルコシルアミン (β -GluNH₂) を、それぞれ対応するアルキル置換チオイミデート 4a-h とピリジン中で反応させることにより合成した。その際、糖の水酸基を保護することなくアミノ基のみを選択的にアミジノ化し、得られた生成物 1a-h はそのまま ODS カラムを用いる逆相カラムクロマトグラフィー (溶媒: 水) によって精製し、凍結乾燥ののち、いずれも潮解性を有する無色ガラス状固体 (白色粉末) として得られた。¹H NMR、¹³C NMR、元素分析、MS 等により生成物の構造と純度を確認した。また、チオイミデート 4a-h は、それぞれ対応するチオアミド 3a-h を臭化メチルで *S*-アルキル化することによって容易に合成し、またチオアミド 3a-h は、市販のもの以外は、対応するニトリルに塩基触媒下 H₂S を付加させる方法 (化合物 3b-d)、あるいは対応するアミドから Lawesson's reagent (4-methoxyphenylthionophosphine sulfide dimer) によってチオアミドとする方法 (化合物 3e-h) によって合成した。チオイミデートはいずれも、pyridine 中、 β -GluNH₂ と速やかに反応したが、チオイミデート 4a のみは、 β -GluNH₂ との反応が遅く、生成物アミジンの収率が低かった。これは、ベンゼン環と共役したイミノカルボニルを持つため反応性が劣ることに加え、一種の酸でもあるチオイミデートが、長時間の反応の間に β -GluNH₂ の二量化を引き起こし、diglucosylamine (Glc)₂NH

を副生したことが主な原因である。酸触媒存在下での β -GluNH₂ の二量化はよく知られた反応である。以上のように、容易に入手可能なアミド、カルボン酸、ニトリル等を出発原料として、さまざまなアラルキル基をアグリコン部分にもつグリコシルアミジン誘導体を合成する一般的方法を確立した。

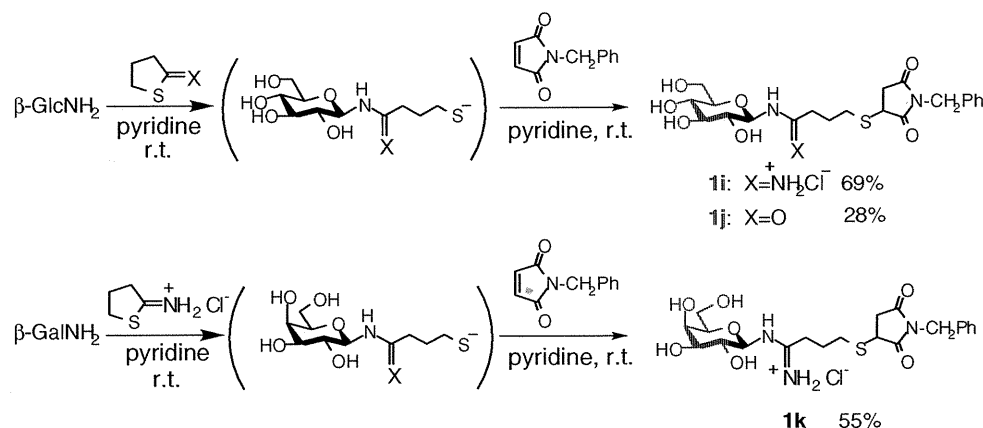


Scheme 1.

化合物 **1h** を除くアミジンは、*cis-trans* 異性を示すことなくすべて単一の生成物として得られたが、化合物 **1h** は、N-C=N 結合に由来する *cis-trans* 異性を生じ、可能なすべての幾何異性体 (Z, E), (Z, Z), (E, E), および (E, Z) のうち、3種類の異性体の混合物として得られた。すなわち、¹H および ¹³C NMR により、(Z, E) : (E, E) : (Z, Z) : (E, Z) = 3 : 1 : 0 : 1 の比を持つ混合物であることがわかった。これら幾何異性体は分離することなく、混合物のままでグリコシダーゼに対する阻害活性を測定した。

一方、単なるアラルキル基ではなく、水素結合の受容体となるスクシンイミドの部分構造をもつ β -glucosylamidinium **1i**、 β -glucosylamide **1j** および β -galactosylamidinium **1k** は、Scheme 2. に示す方法によって合成した。すなわち、 β -GluNH₂ を 2-iminothiolane HCl と反応させることによって開環的アミジノ化に引き続き、末端に生じる SH を N-

benzylmaleimide によりトラップ (Michael 付加) することによりアミジン **1i** を合成した。この場合、2-iminochiolane HCl と *N*-benzylmaleimide を β -GluNH₂ に同時に加え、中間体であるチオールを単離することなくワンポットで反応させることにより、良好な収率でアミジン **1i** を得ることができた。はじめに 2-iminochiolane HCl を作用させ、次いで *N*-benzylmaleimide を加える 2 段階の方法は、収率、生成物の純度という点でワンポットの反応に及ばず、この方法はアフィニティー吸着体を作製する際にも応用した (文献 2 および 3)。ガラクトースから合成した β -ガラクトシルアミン β -GalNH₂ を出発原料に、同様の方法により β -galactosylamidine **1k** を合成した。



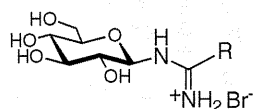
Scheme 2.

一方、2-iminothiolane HCl のかわりに、 γ -thiobutyrolactone を用いて反応を行うことにより、対応する β -glucosylamide **1j** を合成した。 β -GluNH₂ は通常のアルキルアミンよりはるかに塩基性が低いため (プロトン化体の $pK_a=5.6$)、チオラクトンとの反応性に劣り生成物の収率は低かったが、目的の β -glucosylamide **1j** を得ることができた。

合成した一連の β -glycosylamidine 誘導体 **1a-i**, **1k** およびアミド **1j** の、各種グリコシダーゼに対する阻害結果を Table 1 にまとめた。合成したアミジンのうち、グルコシルタイプの amidine **1a-i** はいずれも β -グルコシダーゼに対して強い阻害活性を示したのに対し、 β -ガラクトシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、および β -キシロシダーゼに対しては、ほとんど阻害効果を示さなかった。このことは、本阻害剤が、本来の基質であるグリコシドのグリコン部分をきわめて忠実に再現し、酵素のグリコン部分に対する基質特異性に応じた選択的グリコシダーゼ阻害剤として作用していることを示している。また、ガラクトシルタイプの amidine **1k** が、 β -ガラクトシダーゼを β -グルコシダーゼの 100 倍程度強力に阻害する選択的な阻害剤として作用している事実もこのことを支持している。

β -グルコシダーゼに対する阻害を見た場合、さまざまなアルキル基をアグリコン部位にもつ β -glucosylamidine 誘導体 **1a-i** は、そのアルキル鎖長や構造に関係なく β -グルコシダーゼを拮抗阻害し、微生物起源の酵素に対しては、その阻害定数 (K_i) は 10^{-6} ~ 10^{-9} M のオーダーと、きわめて強力な阻害剤として作用した。しかも、アラルキル基の構造が変わっても、その阻害活性にはそれほど顕著な差が見られず、一様に強い阻害を示した。しかし、植物起源 (アーモンド) の酵素に対しては、例えば化合物 **1a** および **1i** は、50% 阻害濃度 (IC_{50}) が 22 および 13.9 mM 程度と、ほとんど阻害活性を示さなかった。その

Table 1 Inhibition of Glycosidases (K_i [μ M])



R = -Ph

-CH₂Ph

-(CH₂)₂Ph

-(CH₂)₃Ph

-(CH₂)₃CH₃

Cyclo-
pentyl

Cyclo-
pentyl-
methyl

N'-Bn

β -Glc-
Suc-
amidine

β -Glc-
Suc-
amide

β -Gal-
Suc-
amidine

Enzyme	Origin	1a	1b ¹⁾	1c	1d	1e	1f	1g	1h	1i	1j	1k
β -Glucosidase	<i>A. niger</i>	0.18	0.094	0.48	0.054	0.30	0.38	0.36	0.39	0.008	4.90	410
	<i>T. viride</i>	1.7	0.13	0.76	0.35	1.9	0.84	1.4	0.53	0.25	18.5	658
	Almond	22,000 ²⁾	73	180	75	— ³⁾	—	—	—	13,900 ²⁾	—	—
α -Glucosidase	<i>A. niger</i>	≥ 2500 ⁴⁾	≥ 2500	170	220	120	N.I. ⁵⁾	340	53	—	—	N.I.
	<i>Bacillus</i> sp.	N.I.	≥ 2500	≥ 2500	95	≥ 2500	N.I.	980	210	—	—	N.I.
	Yeast	530	73	57	44	310	520	21	34	—	—	N.I.
β -Galactosidase	<i>A. oryzae</i>	≥ 2500	N.I.	N.I.	≥ 2500	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	—	—	15.9
	<i>E. coli</i>	N.I.	N.I.	N.I.	≥ 2500	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	—	—	6.0
α -Galactosidase	<i>A. niger</i>	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	—	—	5.6
β -Xylosidase	<i>A. pulver-</i> <i>ulentus</i>	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	≥ 2500	—	—	N.I.

1) α -Mannnosidase (Jack bean) IC₅₀ = 19,100 [μ M]

2) IC₅₀

3) Not determined

4) IC₅₀ ≥ 2.5 mM

5) No inhibition at 2.5 mM inhibitor

他の amidine 誘導体 **1b**, **c** および **d** についても同様の傾向が見られ、一般に、単純なアラルキル鎖をアグリコン部分にもつ β -glucosylamidine 誘導体は、アーモンド起源の β -グルコシダーゼに対する阻害活性が弱い傾向が見られた。

アルキル鎖長の長さ [化合物 **1a** ($n = 0$), **1b** ($n = 1$), **1c** ($n = 2$) および **1d** ($n = 3$)] と阻害活性の強さを比較すると、 $n = 1$ および 3 の場合、 $n = 0$ および 2 の場合と比較して、1 オーダー程度阻害活性が強くなっていた (*A. niger* の β -グルコシダーゼ)。しかし同じ β -グルコシダーゼでも、起源が異なるとアルキル鎖長の効果は異なり、*T. viride* の酵素では、それほど大きな違いは見られなかった。ただし、アーモンド起源の β -グルコシダーゼでは、例えば、化合物 **1a** ($n = 0$) はほとんど阻害活性を示さなかった ($IC_{50} = 22$ mM) のに対し、化合物 **1b** ($n = 1$) および **1d** ($n = 3$) では $K_i = 70$ μ M 程度の比較的強い阻害を示しており、アグリコン部分の構造が、酵素との親和性に大きな影響を及ぼす場合のあることが判明した。このことは、本阻害剤が、酵素の活性中心付近の構造と基質特異性、特に、アグリコン部の構造が基質特異性に及ぼす影響を解明するための、興味深いツールとなることを示唆するばかりでなく、逆に、アグリコン部分の基質特異性を利用して、特定のグリコシダーゼのみを選択的に阻害する新しい阻害剤となる可能性も示しており、大変興味深い結果である。

アグリコン部分が酵素との親和性に与える影響は、スクシンイミド基をもつ β -glucosylamidine **1i** について特に顕著に見られ、*A. niger* の β -グルコシダーゼに対しては、 K_i にしてわずか 8 nM にも達するきわめて強力な拮抗阻害剤として作用した。この阻害活性は、現在報告されているさまざまな天然由来および合成グリコシダーゼ阻害剤の中でも、最強の部類にランクされる。化合物 **1b** と比較して、スクシンイミド基がつくことにより、阻害活性が約 10 倍上昇していることがわかった。ところが、アーモンド起源の β -グルコシダーゼに対しては、 $IC_{50} = 13.9$ mM であり、ほとんど阻害しなかった。両酵素に対する阻害活性の差、すなわち阻害の選択性は 1.5×10^6 倍にもものぼることが判明した。このことは、上述のように、アグリコン部分の基質特異性を利用すれば、特定のグリコシダーゼのみを阻害する、選択性のきわめて高いグリコシダーゼ阻害剤をデザインできる可能性を強く示唆するものである。一方、amidine **1i** と同じくスクシンイミド基を有し、構造がきわめて類似しているが正電荷を持たない β -glucosylamide **1j** は、amidine **1i** に比べ 600 倍あまり阻害活性が弱く、酵素の阻害においてはアミジンの正電荷が依然として重要であることが確かめられた。それでも、 K_i 値にして 4.9 μ M という強い阻害が見られている事実は、アグリコン部の基質認識によるものと思われる。

一方、 α -グルコシダーゼに対する挙動として、アルキル鎖の伸長に伴い阻害活性が増大する傾向が見られた。すなわち、アルキル鎖長の短い **1a** ($n = 0$), **1b** ($n = 1$) では α -グルコシダーゼをほとんど阻害しないのに対し、アルキル鎖長が伸びると α -グルコシダーゼに対する阻害活性が増大した [**1c** ($n = 2$), **1d** ($n = 3$)]。阻害剤のアノマー位の立体化学は β なので、本来、 β -グルコシダーゼに対して選択的な阻害剤として作用するはずであるが、アルキル基の鎖長が長くなると、その認識があいまいになり、 β -グルコシダーゼのみならず α -グルコシダーゼをも阻害するようになる傾向がうかがわれる。この傾向は、炭素鎖 5 程度のスペーサーのついた β -galactosylamidine **1k** についても見られ、 α -ガラクトシダーゼを、 β -ガラクトシダーゼとほぼ同程度の強さで阻害した。その一方、いずれのグリコシルアミジンも、アグリコン部分に対する特異性は高く、アルキル鎖長が伸びても、 β -glucosylamidine **1a-1d** は依然として、 β -ガラクトシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -キシロシダーゼを阻害せず、また、アグリコン部にスクシンイミド基を好むと

思われる *A. niger* の β -グルコシダーゼにしても、同じスクシンイミド基をもつ β -galactosylamidine **1k** によってはほとんど阻害を受けなかったことは ($K_i = 410 \mu\text{M}$)、やはり、酵素のグリコン部分の構造が決定要因になっていることを示している。以上の結果は、本阻害剤がグリコン部分の基質特異性に応じてグリコシダーゼを見分け、選択的に阻害する阻害剤であることを支持すると同時に、阻害剤のアグリコン部の構造も、酵素との結合にとっては重要であることを示している。

以上のように、合成した一連の β -glycosylamidine 類は、酵素のグリコン部分の基質特異性とアノマー位の立体化学に応じた選択的な阻害活性を示すばかりでなく、グリコン部分の構造によっては、特定のグリコシダーゼのみを阻害するきわめて選択的な阻害剤として作用するユニークな阻害剤であることが確認された。逆に言えば、酵素の基質特異性に合わせて、阻害剤のグリコン部分、アグリコン部分を自在に組み合わせ、最適の阻害剤をつくることのできる、いわば「テーラーメイド」な阻害剤となることが示された。しかし、単純なアラルキル基を導入しただけでは、阻害活性や選択性に大きな違いが見られなかったのも事実である。従って、今後、単純なアラルキル基だけではなく、水酸基やアミドのような親水性の官能基を特定の位置に導入し、酵素のアグリコン結合部位との積極的な相互作用を利用してより強力な高い選択性をもったアミジン誘導体を合成展開してゆく必要がある。また、酵素のアノマー位立体特異性に対応させて、 α -グリコシダーゼを阻害するために、一連の α -glycosylamidine 類を合成してゆく必要がある。

1-3. β -Glycosylamidine 誘導体の構造と基本的物性

β -グリコシルアミジンは、グリコン部分に関して、糖のピラノース環の構造をそのまま保持しているため、基質であるグリコシドときわめて近い構造を持っていると考えられる。そこで、典型的な β -グリコシルアミジンである **1d** と、典型的な β -グルコシドである benzyl β -D-glucopyranoside との、水中における ^1H NMR データを比較した (Figure 1)。

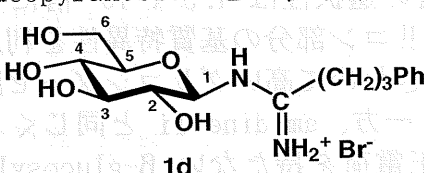
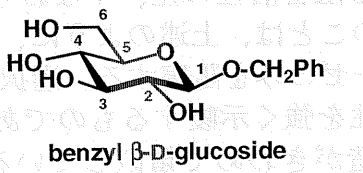
 <p>1d</p>	 <p>benzyl β-D-glucoside</p>
<p>H-1: δ 4.78, $J_{1,2} = 9.2 \text{ Hz}$ H-2: δ 3.51, $J_{2,3} = 8.8 \text{ Hz}$ H-3: δ 3.66, $J_{3,4} = 9.2 \text{ Hz}$ H-4: δ 3.46, $J_{4,5} = 9.6 \text{ Hz}$ H-5: δ 3.58, $J_{5,6a} = 5.4 \text{ Hz}$ $J_{5,6b} = 2.0 \text{ Hz}$ H-6a: δ 3.75, $J_{6a,6b} = 12.4 \text{ Hz}$ H-6b: δ 3.98, $J_{6b,6a} = 12.4 \text{ Hz}$</p>	<p>H-1: δ 4.49, $J_{1,2} = 8.0 \text{ Hz}$ H-2: δ 3.29, $J_{2,3} = 9.0 \text{ Hz}$ H-3: δ 3.44, $J_{3,4} = 9.4 \text{ Hz}$ H-4: δ 3.37, $J_{4,5} = 8.5 \text{ Hz}$ H-5: δ 3.40, $J_{5,6a} = 5.6 \text{ Hz}$ $J_{5,6b} = 1.9 \text{ Hz}$ H-6a: δ 3.70, $J_{6a,6b} = 12.3 \text{ Hz}$ H-6b: δ 3.90, $J_{6b,6a} = 12.3 \text{ Hz}$</p>

Figure 1. ^1H NMR (in D_2O) of β -glucosylamidine **1d** and benzyl β -D-glucopyranoside

その結果、 β -グリコシルアミジンは、 D_2O 中で、 β -D-グルコピラノシドときわめて近い形を取っており、カップリング定数の値から、両者は、ほぼイス型のコンフォーメーションであることが確かめられた。すなわち、 β -グリコシルアミジンは基質アナログとしての構造的要因を備えている阻害剤で、酵素のグリコン基質特異性に対応した選択的阻害を示す

結果とも一致している。

次に、 β -グリコシルアミジンの塩基性度を測定した。一般に、アルキルアミジンの塩基性は非常に高く、acetamidine の共役酸の pK_a は 12.4 と報告されている。また、ベンゼン環と共役している benzamidine でも、共役酸の pK_a は 11.6 であり、対応するアミンと比べて、その塩基性度は 2 桁以上大きい。しかし、 β -グリコシルアミジンは、アミジノ基を構成する窒素原子の一つがグリコシル基の 1 位に直接結合し、一種のアミナール窒素となっているため、ピラノース環の酸素原子に由来する電子吸引効果を受け、塩基性度が下がっている可能性がある。事実、構造的に対応するアミンである β -glucosylamine では、その共役酸の pK_a は 5.6 であり、この値は、通常のアミンよりはるかに低い。そこで、 β -グリコシルアミジン誘導体の pK_a 値を知るために、 β -glucosylamine 1d を用いて、その半量を NaOH で中和したときの水溶液の pH を測定することにより、1d の pK_a 値を求めた。その結果、25°C の水中において、 $pK_a=9.39$ という値が得られた。このことから、 β -グリコシルアミジンは、通常のアミンに比べると、3 桁ほど塩基性度が低いことがわかった。この塩基性度の低下は、アルキルアミンに比べて β -グリコシルアミンの塩基性度が 3 桁以上低いことともよく対応し、ピラノース環の酸素による電子吸引効果によるものと思われる。しかし、 pK_a 9.39 という値は、中性付近では完全にプロトン化しているだけの十分な塩基性度を持つことを示し、グリコシダーゼのアッセイで用いる pH 5-6 付近の弱酸性領域では、間違いなく完全にプロトン化した状態で存在し、酵素との結合や阻害活性も、プロトン化した状態で起こっていることを示唆している。

さて、文献 1 および文献 2 にも詳述したとおり、 β -グリコシルアミジンは、酸性条件下ではかなり安定である一方、アルカリ性条件下では徐々に加水分解を受け、対応する β -グリコシルアミドを定量的に生成する (25°C, carbonate buffer (pH 10) 中での半減期 24 hr, 25°C, 1M NaOH 中での半減期 5 hr)。また、加水分解産物である β -グリコシルアミドには、酵素阻害活性がほとんどないこともわかっている。そこで、 β -glucosylamine 1b および、それに対応する β -galactosylamine, β -xylosylamine のそれぞれを、pH の異なる緩衝液中に 10 mM になるように溶解し、室温で 180 日間にわたってインキュベートし、残存する酵素阻害活性を指標に、それぞれのアミジンの安定性を調べた (Figure 2)。

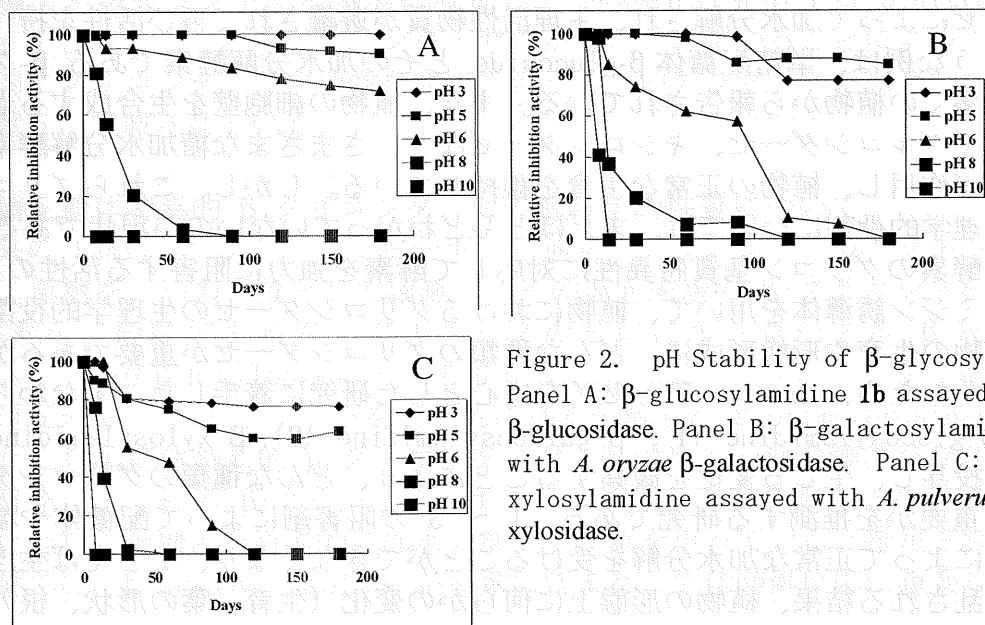


Figure 2. pH Stability of β -glycosylamines. Panel A: β -glucosylamine 1b assayed with *A. niger* β -glucosidase. Panel B: β -galactosylamine assayed with *A. oryzae* β -galactosidase. Panel C: β -xylosylamine assayed with *A. pulverulentus* β -xylosidase.

その結果、pH 8 以上の緩衝液に保持した場合、アミジンの阻害活性はグリコン部の種類に関係なく急速に低下した。一方、 β -glucosylamidine **1b** は pH 3 においては非常に安定であり、阻害活性の低下は半年間認められなかった。pH 5 では、保持開始 120 日目から緩やかに阻害活性の低下が起こったが、180 日後でも 90%以上の活性は維持された。 β -Glucosylamidine が安定であったこれらの pH 領域 (pH 3-5) において、対応する β -galactosylamidine および β -xylosylamidine の場合は、保持直後から阻害活性の低下が認められた。保持開始 180 日後では、直後と比較して 70%前後まで阻害活性の低下が認められた。特に pH 6 においては、 β -glucosylamidine と比較して活性の低下が顕著であり、グリコン部位の違いによって、溶液安定性に差があることが明らかになった。このことは、グルコピラノシドがコンフォーメーション的に最も安定であることと対応し、 β -グリコシルアミジンの加水分解に、ピラノース環のコンフォーメーション変化が関与していることが示唆される。しかし、いずれのアミジンも、pH 3 以下の酸性領域では、きわめて安定に存在することが確かめられた。

(2) β -グリコシルアミジン誘導体をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィー

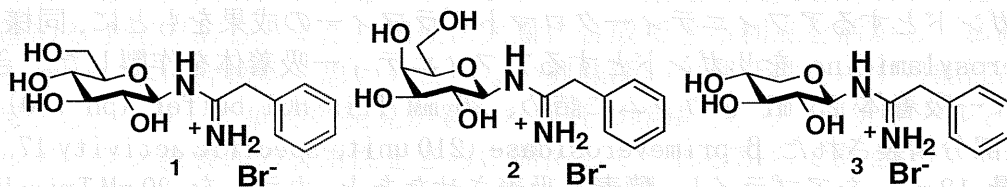
以上のように、 β -グリコシルアミジン誘導体が、基質アナログとして作用し、酵素のグリコン特異性によく対応して、選択的に酵素を阻害する阻害剤であることがわかった。この性質を利用して、 β -グリコシルアミジンをリガンドとするアフィニティー吸着体を作製し、これを用いて、グリコン特異性の異なる酵素をアフィニティー精製した。得られた成果は、文献 2 (Hiratake, J.; Sakata, K. *Methods in Enzymology* **363**, 421-444 (2003)) および文献 3 (Inoue, K.; Hiratake, J.; Mizutani, M.; Takada, M.; Yamamoto, M.; Sakata, K. *Carbohydr. Res.* **338**, 1477-1490 (2003)) に記載されている。

(3) β -グリコシルアミジン誘導体を用いた植物 β -グリコシダーゼの生理機能の探索

植物の生長や環境応答に深く関わる生理活性物質は、多くの場合、配糖化 (β -グリコシル化) を受けて一時的に不活性化され、その形で植物体内に貯蔵されている。配糖体はグリコシダーゼによって加水分解され、生理活性物質が遊離されて再び活性を持つようになる。このような例は、単糖配糖体 β -glucoside とその加水分解酵素である β -グルコシダーゼとして多くの植物から報告されている。また、植物の細胞壁を生合成する過程でも、セルラーゼやグルコシダーゼ、キシロシダーゼなど、さまざまな糖加水分解酵素 (グリコシダーゼ) が作用し、植物の正常な生育を維持している。しかし、これらグリコシダーゼの同定と生理学的役割については、まだほとんどわかっていないのが現状である。

そこで、酵素のグリコン基質特異性に対応して酵素を強力に阻害する活性のある β -グリコシルアミジン誘導体を用いて、植物におけるグリコシダーゼの生理学的役割を探るとともに、植物の生育や形態形成に、どんな種類のグリコシダーゼが重要であるかについての糸口をつかむため、*in vivo* アッセイを中心とした研究に着手した。すなわち、3 種類の阻害剤 β -glucosylamidine (**1**), β -galactosylamidine (**2**), β -xylosylamidine (**3**) を植物体に直接投与し、生じる変化を観察することにより、どんな種類のグリコシダーゼが植物にとって重要かを推測する研究である。**1** ~ **3** の阻害剤によって配糖体や糖鎖がグリコシダーゼによって正常な加水分解を受けることができなくなり、たとえば生理活性物質の恒常性が乱される結果、植物の形態上に何らかの変化 (生育、葉の形状、根の伸長、屈

性、花芽形成など)が生じることが予想される。そこで、逆に、アッセイの結果、引き起こされる形態上の変化を手がかりにして、グリコシダーゼが関与する生理現象を探索し、各阻害剤の標的となる未知の植物グリコシダーゼの生理機能を明らかにすることを目的として研究を行った。得られた研究成果は、文献4に記載した。



(4) その他の成果

4-1. グリコシダーゼの連続的分光学的アッセイ法の開発

グリコシダーゼのアッセイには、chromogenic な人工基質である *p*NP-glycoside や *o*NP-glycoside、4-methylumbelliferyl glycoside がよく使われ、酵素反応に伴って遊離する *p*-nitrophenol や *o*-nitrophenol, 4-methylumbelliferone を分光学的に定量することにより、酵素反応の初速度を求めることが一般的である。しかし、多くの場合、glycosidase の至適 pH が、pH 5 付近の弱酸性領域にあるため、実際の反応では、一定時間の酵素反応ののち、 Na_2CO_3 等のアルカリを加えて一旦反応を止めるとともに、反応溶液の pH を上げ、遊離する *p*-nitrophenol や *o*-nitrophenol, 4-methylumbelliferone が発色し、波長シフトを起こすアルカリ性条件下で定量を行わなければならない。これは、酵素反応の初速度を求める際には、各時間ごとに、いちいち反応を停止させなければならない、実験量が飛躍的に増えるため、速度論的パラメーターの測定など、非常に面倒な実験操作が必要となる。もし、反応を止めることなく、連続的に酵素反応を追跡することができれば、1回の測定で初速度が求められ、グリコシダーゼのアッセイがきわめて簡略化できる。そこで、本研究代表者らは、2-hydroxy-3-nitropyridine が、互変異性によって、弱酸性領域でも波長シフトする事実に着目し、この発色団を有する 3-nitro-2-pyridyl glycoside を合成し、それをグリコシダーゼの基質として用いることによって、弱酸性側でも連続的にグリコシダーゼの活性を測定できる新しいアッセイ法を開発した。本研究の成果は文献5に記載されている。

4-2. 二糖配糖体特異的 β -グリコシダーゼの酵素学的性質について

植物由来の Family 1 β -グリコシダーゼは、通常、グルコシドやガラクトシド、マンノシドなど、単糖を一つの単位として認識し、その還元末端の β -グリコシド結合を加水分解する酵素が一般的であるが、グルコースの6位にキシロースが β -結合した β -primeverosyl (6-*O*- β -D-xylopyranosyl- β -D-glucopyranosyl) ユニットを二糖単位で認識し、その還元末端で β -グリコシドを特異的に加水分解する β -primeverosidase や、それに類似した二糖配糖体特異的 β -グリコシダーゼと呼ばれる一群の酵素が存在している。これらの酵素は、一般の β -グルコシダーゼとは異なり、生体防御などの特殊な生理機能をもった化合物の配糖体を特異的に加水分解する役割を担っていると推定されている。特に、チャ葉では、 β -primeverosidase が多量に含まれ、生体防御反応に重要な役割を果た

しているとともに、ウーロン茶や紅茶などの発酵茶の製造工程においては、本酵素が香気生成に中心的な役割を果たすことが推定されている。そこで、 β -primeverosidase の基質特異性を中心に、本酵素の酵素学的性質を明らかにする研究を行った（文献6および7）。

一方、本酵素が二糖単位で基質を認識する機構を調べるため、本酵素の立体構造解明をめざして本酵素の大量精製を試みた。文献2および3で述べた、 β -グリコシルアミジン誘導体をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーの成果をもとに、同様の方法で、 β -primeverosylamidine をリガンドとするアフィニティー吸着体を作製した。合成したアフィニティー吸着体 25 ml をカラムに詰め、20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) で平衡化したのち、部分精製された β -primeverosidase (210 unit, specific activity 17.7 unit/mg, タンパク量 12 mg) をアプライし、酵素を吸着させたあと、カラムを 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) で洗浄した。その後、カラムを 20 mM acetate-NaOH buffer (pH 4.0) で溶出させたところ、 β -primeverosidase が特異的に溶出された (207 unit, specific activity 26.8 unit/mg, タンパク量 8 mg)。活性の回収率は 98% にのぼり、酵素は 1.51 倍に精製された。回収された酵素を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で確認したところ、電気泳動的に単一のバンドを与える純度にまで精製されていた。すなわち、 β -primeverosylamidine をリガンドとするアフィニティー吸着体により、 β -primeverosidase の大量精製に目処がつき、純度の高い酵素が多量に得られるようになった。この成果をふまえ、今後、酵素の結晶化と X 線結晶構造解析に向けて研究を進める予定である。

おわりに

グリコシダーゼ研究にとって有用な研究ツールは、酵素のグリコン基質特異性に応じて選択的に酵素を阻害することのできる化合物であるという発想から出発した本研究は、当初の目標どおり、酵素のグリコン基質特異性ならびにアグリコン特異性にも対応して自在に設計・合成することのできる β -グリコシルアミジン誘導体という新規なグリコシダーゼ阻害剤を開発するに至った。そして、それが実際に有用な研究ツールとなることを、アフィニティーリガンドとして、グリコシダーゼのアフィニティー精製に応用することによって実証した。現在、得られたグリコシダーゼのアミノ酸配列から、その酵素をコードする遺伝子のクローニングにまで着手しており、これが完成すれば、構造未知のグリコシダーゼを、グリコン基質特異性を唯一の手がかりとして単離・精製し、遺伝子のクローニングから構造解析までを網羅する、一連のグリコシダーゼの生物有機化学的研究のサイクルが完結することになる。

β -グリコシルアミジン誘導体が、さまざまな糖から出発して、簡便にしかも大量に合成できるということは、研究ツールとしてきわめて大きな意味をもつ。というのは、さまざまなバイオアッセイに対して大量にサンプルを供給することができるばかりでなく、1つのバイオアッセイに対して、異なるグリコン部をもつ一連のグリコシダーゼ阻害剤をセットで供給できるため、どのグリコシダーゼが生理的に重要であるのかが推定できるのである。すなわち、それぞれの阻害剤の生理活性試験の結果を比較することにより、その生理活性に関わるグリコシダーゼのグリコン基質特異性が推定できるのである。このことは、 β -グリコシルアミジン誘導体を、直接、植物に与えた時に観察される変化を手がかりに、植物の生育にとって重要な働きをしている未知のグリコシダーゼを推定しようという *in vivo* 試験によって検証されつつある。そして、ひとたびグリコン基質特異性が特定されれば、当該グリコンをもとにアフィニティー吸着体を作製し、目指す酵素を単離、精製す

るという上述の研究手法が適用できる。すなわち、生理的に重要な働きをするグリコシダーゼを推定するところから出発し、当該酵素の単離・精製を経て、遺伝子のクローニング、大量精製から構造解析に至るまで、グリコシダーゼ研究のあらゆる段階で力を発揮する、きわめて有用な研究ツールとなることが期待できる。今後、 β -グリコシルアミジン誘導体をよりどころとして、植物におけるグリコシダーゼの生理的役割を解明する化学的研究を精力的に進める予定である。また、簡便に大量に合成できる利点を活かし、広範なバイオアッセイを行い、本化合物が、思いもよらない興味深い生理活性を示す可能性にも期待したい。なぜなら、こうした偶然の発見が新たな研究の端緒となり、研究ツールとしての β -グリコシルアミジン誘導体の有用性をさらに開拓してくれるからである。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、最初に β -グリコシルアミジン誘導体の合成を手がけ、基本的な物性と阻害活性を測定してくれた郭 ブン飛 (Wenfei Guo) 博士 (現 浙江大学化学学科助教授) に感謝いたします。また、その後の本化合物の合成展開において中心的役割を果たしてくれている大学院生の加藤正宏氏 (博士課程3年在籍中) に深謝いたします。共同研究者として、酵素のアッセイ、生物試験等でご尽力いただいた株式会社日本食品化工の小川浩一氏、山本幹男氏に深く感謝いたします。また、グリコシダーゼのアフィニティークロマトグラフィーに尽力してくれた卒業生の井上和子氏、ポスドクの張 正竹博士 (現 安徽農業大学助教授)、ならびに、植物に対する *in vivo* 試験を行ってくれた卒業生の小林由里子氏に深く感謝いたします。馬 勝ジン (Seung-Jin Ma) 博士 (現 カリフォルニア大学デーヴィス校博士研究員) は、 β -primeverosidase の基質特異性解明やグリコシダーゼの連続的分光学的アッセイ法の開発を精力的に進めてくれ、ここに深謝いたします。また、共同研究者として、グリコシダーゼの連続的分光学的アッセイ法の開発を進めていただいた、大阪大学理学部教授の楠本正一博士、同じく助教授の深瀬浩一博士とその院生諸君に深く感謝いたします。

本研究は、主として、京都大学化学研究所生体触媒化学研究室で行われたものであり、 β -primeverosidase をはじめとする二糖配糖体特異的グリコシダーゼの研究を通じて、数限りない研究支援と機会を提供して下さった教授の坂田完三先生および清水文一助手に深く感謝するとともに、研究を推進する原動力となった大学院生諸君、試料の提供や測定などでお世話になった多くの方々に、この場を借りて、厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究は、科学研究費補助金 (基盤研究 (B) (2)) を受けて行われたもので、日本学術振興会ならびに文部科学省に対し、厚く御礼申し上げます。